Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. E. Wollheim

Über die Freisetzung sympathischer Überträgerstoffe durch Glukagon beim Menschen

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Helmut Klusmann
aus Celle

Würzburg 1966

1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544722_0037

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. E. Wollheim

Über die Freisetzung sympathischer Überträgerstoffe durch Glukagon beim Menschen

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Helmut Klusmann
aus Celle

Würzburg 1966

Referent: Priv.Doz. Dr. H.J. Kuschke

Korreferent: Professor Dr. E.Wollheim

Tag der Promotion: 1. 3. 67

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einführung und Problemstellung	1
2. Material und Methoden	6
a) Versuchspersonen und Anordnung	6
b) Methodik der Katecholaminbestimmung	7
c) Berechnung der KA-Werte	7
d) Behandlung der Blutproben	8
e) Vorbereiten des Ionenaustauschers	9
f) Präparation der Säulen zur Isolierung der KA	9
g) Oxydation der Katecholamine	10
3. Ergebnisse	12
4. Diskussion	15
5. Zusammenfassung	17
6. Literaturverzeichnis	19

1. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die beiden blutzuckersteigernden Hormone ADRENALIN, sympathische Überträgersubstanz und Wirkstoff des Nebennierenmarks, und das in den A-Zellen der Langerhans' schen Inseln gebildete GLUKAGON haben neben der hyperglykämischen noch einige weitere gemeinsame Wirkungen. In der vorliegenden Untersuchung wird dem Mechanismus dieses Wirkungszusammenhanges nachgegangen und der Einfluß auf das sympatho-adrenale System durch Glukagon am Menschen untersucht.

Zunächst seien die wesentlichen biologischen Wirkungen beider Hormone kurz ins Gedächtnis gerufen:

ADRENALIN steigert am Herzen die Kontraktionsamplitude und die Frequenz und damit das Herzminutenvolumen. Es übt einen positiven Einfluß auf nomotope und heterotope Reizbildung aus, steigert den O_2-Verbrauch, hauptsächlich als Folge erhöhter Arbeit, verengt in physiologischen Dosen die Gefäße mancher Bereiche (Haut und Splanchnikusgebiet) und erweitert andere, wie die des Herzens und der Skeletmuskulatur. An der übrigen glatten Muskulatur läßt es die Bronchien, den Darm, Pylorus, Kadia und Blase erschlaffen. In Bezug auf den Stoffwechsel steigert es den Sauerstoffverbrauch aller Zellen, erhöht den Grundumsatz, fördert den Glykogenzerfall, besonders in der Leber und bewirkt damit einen Blutzuckeranstieg. Diese Hyperglykämie wird aber durch weitere Faktoren mitbedingt. So nahm WIECHMANN als erster an, daß Adrenalin die Glukoseassimilation der peripheren Gewebe herabsetze. Er sah beim Menschen eine niedrigere arterio-venöse Differenz an Glukose während einer durch Adrenalingabe erzeugten Hyperglykämie als bei der gleichen Blutzuckersteigerung durch Glukoseinfusion. Dieser Befund wurde in der Folge, sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen bestätigt (CORI und CORI 1929, CORI et al. 1935, SOMOGYI 1951, AMATUZIO 1954, ITALLIE et al 1955)

Adrenalin soll weiterhin die Muskelglykolyse steigern (SHUTERLAND 1950, KREISBERG und WILLIAMSON 1964), wodurch Milchsäure vermehrt anfällt.

Es konnte gezeigt werden, daß die Milchsäure wesentlich für die Leberglukoneogenese über den Milchsäurezyklus verantwortlich ist (CORI 1945-46) und somit indirekt der Blutzuckerspiegel beeinflußt wird.

Die Existenz eines zweiten Pankreashormons ist seit mehr als 40 Jahren bekannt.
1923 beschrieben MURLIN und Mitarbeiter zum ersten Mal eine initiale Hyperglykämie, welche einer durch Pankreasextrakt erzeugten Blutzuckererniedrigung vorausging. Sie vermuteten daher einen Blutzucker steigernden Stoff in diesem Extrakt, für welchen sie den Namen GLUKAGON vorschlugen.

Einige Jahre später berichteten BÜRGER und KRAMER (1928) das gleiche paradox erscheinende, vorübergehend hyperglykämische Phänomen bei der Gabe von amorphem Insulin. Doch schon 1930 erkannten dieselben Autoren, daß eine initiale Blutzuckersteigerung nach kirstallinem Insulin nicht zu beobachten war.

Diese Tatsachen wurden lange Zeit nicht beachtet, und, worauf von DUVE und BERTHET (1957) aufmerksam gemacht wurde, es verneinten die meisten Autoren eine mögliche Verunreinigung ihrer Insulinpräparate mit Glukagon. Erst seit 1945 fand dieses Hormon eine stärkere Beachtung und gab Anlaß zu zahlreichen Untersuchungen über seinen Ursprungsort, den genauen Wirkungsmechanismus seiner Stoffwechseleffekte in Bezug auf Kohlehydrate, wie aber auch auf Lipide, Proteine und sogar Elektrolyte und über seine physiol. Wirkung sowie Anwendung in der Klinik.

1953 gelang es der Gruppe STAUB, SINN und BEHRENS, den "hyperglykämisch-glykogenolytischen Faktor" durch Kristallisation rein darzustellen und einige Jahre später klärten BROHMER, SINN und BEHRENS (1957) die genaue Strukturformel auf.

Erst 1961 gelang es UNGER und Mitarbeitern durch eine radioimmunologische Technik, das Glukagon eindeutig als zweites Pankreashormon nachzuweisen.

Die Wirkungsanalysen beider Hormone, des Adrenalins und des Glukagons, haben gezeigt, daß sie einige gemeinsame biologische Wirkungen besitzen. Es wurden im einzelnen folgende Befunde mitgeteilt:

Beide Substanzen haben eine glykogenolytische Wirkung an der Leber mit initialer Phosphorylaseaktivierung (SUTHERLAND und RALL 1960). Dabei sind folgende chemische Vorgänge aufgeklärt worden: Beide Stoffe fördern in vielen Geweben die Umwandlung von Adenosintriphosphat in Adenosin-3,5'-phosphat, ein zyklisches Nukleotid. Für diese Umwandlung benötigt das Ferment noch Magnesium. Vom zyklischen Adenosinmonophosphat hängt die Bildung einer aktiven Phosphorylase ab, die ihrerseits neben Adrenalin für die Glykogenolyse erforderlich ist.

Durch vergleichende Befunde an den Herzen intakter Hunde fanden REGAN und Mitarbeiter (1964) ganz ähnliche Reaktionen auf Glukagon und Adrenalin. Beide Hormone bewirkten einen Abfall an freien Fettsäuren, eine gesteigerte Milchsäureproduktion, ein Ansteigen des Respiratorischen Quotienten sowie der O_2-Aufnahme des Herzens; sie zeigten weiterhin große qualitative Ähnlichkeit, was die gesteigerte Kontraktilität des linken Ventrikels und seine Frequenz anbetrifft, ebenso in Bezug auf Änderung der ST-T-Strecke im Elektrokardiogramm.

FARAH und TUTTLE (1960) sowie KREISBERG und WILLIAMSON (1964) wiesen eine nahezu identische Wirkung am isoliert durchströmten Herzen einiger Tierspezies nach, nämlich einen positiv inotropen und einen metabolischen Effekt mit anfänglicher Glykogenolyse und folgender Steigerung der Glukoseaufnahme, -Phosphorylierung und -Oxydation, allerdings in höheren als physiologischen Glukagonkonzentrationen.

Schließlich hemmt Glukagon wie Adrenalin den Rattenuterus (DRESSE, LEVEBVRE, LECOMPTE u. CAUWENBERGHE 1961), den isolierten Ratten- u. Katzendarm (FARAH u. TUTTLE 1960) und die Darmmotilität beim Menschen (DOTEVALL u. KOCK 1963).

Diese gemeinsamen Wirkungskomponenten der beiden Stoffe können durch einen Angriff an demselben Effektorsystem erklärt werden oder auch mit

einer Vermittlung gewisser Glukagonwirkungen durch eine Freisetzung der sympathischen Überträgerstoffe.

Der letztere Mechanismus Glukagon ⟶ Adrenalinfreisetzung wird durch tierexperimentelle Befunde nahegelegt:
an der in situ durchströmten Nebenniere des Hundes führen Glukagonkonzentrationen über 1 µg/ml zu einer starken Steigerung der Konzentration beider Katecholamine im Nebennierenvenenblut (SCIAN, WESTERMANN et al. 1960, SARCIONE et al. 1963).

LEFEBVRE u. Mitarbeiter (1961) machen auf eine deutliche Erniedrigung des Adrenalins und Noradrenalins in Rattennebennieren aufmerksam, die sie 15 min nach Injektion von 1 µg/g Glukagon nachwiesen. Sie vermuten, daß eine Freisetzung von Adrenalin durch Glukagon einige Effekte des Letzten erklärt.

SARCIONE et al. (1963) fanden im Nebennierenvenenblut von Hunden 60 min nach Injektion von 50 µg/kg Glukagon einen maximalen Anstieg von Adrenalin auf das Siebenfache und von Noradrenalin auf das Doppelte. Sie weisen darauf hin, daß die Steigerung der Plasmakatecholamine, sowohl unter Insulinhypoglykämie als auch während Glukagonhyperglykämie die Mittlerrolle in dem Mechanismus Blutzuckererniedrigung ⟶ Adrenalinfreisetzung vermuten läßt, und sie verweisen auf die Ergebnisse von UNGER et al. (1962), denen der erste spezifische Beweis für endogenes Glukagon im Plasma von Hunden gelungen war und für den direkten Einfluß der Blutzuckererniedrigung auf seine Freisetzung, indem sie den eindeutigen Anstieg des Hormons nach Phlorrhizingaben oder Insulinhypoglykämie zeigen konnten.

Schon früher wurde vermutet, daß an der Glukagonhyperglykämie neben der hepatischen Glykolyse eine Hemmung der Glukoseaufnahme in der Peripherie infolge einer endogenen Adrenalinwirkung beteiligt sei (SARCIONE et al. 1960). Die Autoren fanden keinen oder nur einen geringen Blutzuckeranstieg nach 0,4 mg/kg Glukagon bei der NN-Markлosen oder DHE-behandelten Ratte. In einem Vergleichsversuch konnte durch 0,05 mg/kg Adrenalin die hyperglykämische Reaktion auf Glukagon wiederhergestellt werden. Daraus schlossen sie auf eine durch Adrenalin bedingte, erniedrigte periphere Glukose-

aufnahme als Voraussetzung für den hyperglykämischen Effekt des Glukagons, wenn auch nicht für seine glykogenolytische Wirkung.

Beim Menschen wurde nach Injektion von 1 mg Glukagon bei einem Teil der Untersuchten eine Steigerung der Harnausscheidung des Katecholaminmetaboliten 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure gefunden, die auf eine Katecholaminfreisetzung durch Glukagon deutet (SCHMID u. Mitarbeiter 1964).

Die angeführten tierexperimentellen Befunde machen z. T. den Mechanismus Glukagon ⟶ Adrenalinfreisetzung wahrscheinlich.

In meinen eigenen Untersuchungen sollte versucht werden, ob sich auch beim Menschen ein direkter Beweis für eine gesteigerte Freisetzung von Sympathikusstoffen nach Glukagon in niedriger Dosierung erbringen läßt. Dazu wurden der Blutzucker und der Plasmaspiegel an Katecholaminen nach intravenöser Glukagongabe untersucht.

Wenn die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin an der Entstehung der Glukagonhyperglykämie beteiligt sind, sollte es zu einer Abnahme der Hyperglykämiereaktion kommen,nachdem ihre Gewebskonzentration beträchtlich herabgesetzt ist.

Diesen Überlegungen folgend wurden Untersuchungen mit dem gleichen Versuchsgang vor und nach einer hochdosierten Reserpinbehandlung durchgeführt.

Reserpin, das Hauptalkaloid der Rauwolfia, setzt die adrenerge Überträgersubstanz aus den sympathischen Nervenfasern frei, wo sie in mikroskopischen Strukturen, den Granula, gespeichert ist. Es kommt zum Abbau der freigesetzten Überträgersubstanz durch oxydative Desaminierung und der Gewebsspiegel sinkt ab. Damit nimmt, bedingt durch den Mangel an Überträgersubstanz, die Effektivität der sympathischen Erregung in entsprechendem Maße ab.

2. MATERIAL UND METHODEN

a) Versuchspersonen und -Anordnung

Entsprechend den vorher angeführten Gesichtspunkten ergaben sich zwei Versuchsanordnungen.

1. Blutzucker und KA nach Glukagon.

Diese Gruppe umfaßt 12 Studenten und Ärzte der Klinik. Den nüchternen Probanden wurden unter Ruhebedingungen (3 Std. nüchtern) die zur KA- und Blutzuckerbestimmung erforderlichen Blutmengen abgenommen und anschließend 1 mg Glukagon[+)] langsam innerhalb von 3 min i.v. gespritzt. Es folgten weitere Entnahmen nach a) je 5 und 15 min, b) je 10 und 20 min c) je 15 und 30 min, vom Beginn der Glukagoninjektion gerechnet. Während der gesamten Zeit wurden Puls und Blutdruck registriert.

Bei zwei Probanden erfolgte unter Wiederholung des gleichen Versuches Injektion von physiol. Kochsalzlösung an Stelle von Glukagon.

2. Blutzucker und KA nach Glukagon vor und nach Reserpinbehandlung.

Hierbei handelt es sich um 6 psychisch Kranke der Universitäts Nervenklinik Würzburg[++)]. Die Patienten wurden mit 12 mg Reserpin/die behandelt. Die Versuche wurden jeweils direkt vor Beginn der Behandlung und nach fünf Tagen Therapie durchgeführt. Ähnlich wie bei der ersten Gruppe wurde im Anschluß an den KA- und Blutzucker-Ruhewert bei nüchternen Probanden der Blutzuckeranstieg nach 1 mg Glukagon geprüft und zwar nach 10, 20, 30 und 45 min oder 15, 30, 45 und 60 min, die KA-Werte nach 30 min.

Die Blutzuckerbestimmung erfolgte in Doppelbestimmungen nach HAGEDORN-JENSEN.

Um den Plasmakatecholaminspiegel möglichst wenig durch psychische Momente wie Erregung oder Schmerz zu beeinflussen, wurden die Versuchspersonen, auf einem Ruhebett liegend, einige Zeit auf Puls und Blutdruck kontrolliert

---

+) Präparat der Fa. Lilly, Giessen

++) Herrn Prof. Dr. Scheller und seinen Mitarbeitern danken wir für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

und erst nachdem ein konstantes Niveau erreicht war die Blutproben abgenommen. Schon einige Zeit davor wurde die Kanüle gelegt, durch die dann alle erforderlichen Entnahmen ausgeführt wurden. Sie konnte freigehalten werden durch wiederholtes Spülen mit einem Gemisch aus einem geringen Prozentsatz Heparin und physiol. Kochsalzlösung. Es wurde darauf geachtet, daß die Nadel schmerzfrei lag.

b) Methodik der Katecholaminbestimmung

Zum Nachweis der KA im Plasma wurde die fluorimetrische Methode benutzt, welcher die Trihydroxyindolreaktion zugrunde liegt: A und NA werden zu Adrenochrom und Noradrenochrom oxydiert, die sich in alkalischem Milieu zu stark fluoreszierenden Trihydroxyindolen umlagern, nämlich zu Adrenolutin bzw. Noradrenolutin. Diese fluoreszierenden Produkte können durch Zugabe eines Antioxydans für einige Zeit stabilisiert werden, welche zu ihrer fluorimetrischen Messung benutzt wird.

Es wurde im Prinzip die von HÄGGENDAL 1963 angegebene Methode übernommen, die sich besonders für den Nachweis geringer Konzentrationen von Katecholaminen im Plasma eignet. Sie wurde in einigen Punkten gering variiert und abgekürzt.

c) Berechnung der KA-Werte

Da nach den Erfahrungen von KUSCHKE und Mitarbeitern eine Differenzierung der KA in Adrenalin und Noradrenalin nicht mit der wünschenswerten Zuverlässigkeit möglich ist, erfolgten die Messungen gegen einen jeweils frisch angesetzten NA-Standard, d.h. 0,1 µg NA, die wie die normalen Proben oxydiert wurden.

Diese 0,1 µg und ihr abgelesener Ausschlag auf dem Spektrofluorometer, abzüglich der Extinktion des Reagensleerwertes, werden in Beziehung gesetzt zu der vermuteten KA-Menge in der Probe (d.h. X) und der Differenz zwischen Eluatleerwert und Eluatwert. Unter Berücksichtigung des Verhältnis

der oxydierten Probe (2 ml) zur Gesamteluatmenge wird das Ergebnis in µg NA-Äquivalenten pro 1000 ml Plasma angegeben. Hierzu ist es erforderlich, die effektive Plasmamenge einer Blutentnahme aus dem gesamten abhebbaren Überstand nach Zentrifugieren des Blut-Antikoagulansgemisches zu ermitteln. Dazu dient eine von WEIL-MALHERBE angegebene Formel. (Überstand möglichst quantitativ erfassen).

$$\frac{\text{Gesamt ml in der Spritze} - \frac{\text{dto} \cdot \text{HKt}}{100} - \text{ml Antikoagulans}}{\text{Gesamt ml in der Spritze} - \frac{\text{dto} \cdot \text{HKt}}{100}} \times \text{gesamter abhebbarer Überstand}$$

d) Behandlung der Blutproben

In einer 20 ml Spritze wurden zu 2 ml Antikoagulans (= 1 g EDTA-Na ad 100 physiol. Kochsalzlösung) 18 ml Blut aufgezogen und anschließend gut durchmischt. Von diesem Gemisch wurde eine Probe zur Bestimmung des Hämatokrits entnommen, dann der Inhalt der Spritze zu gleichen Teilen in zwei Zentrifugengläser entleert, welche in einem mit Eiswasser gefüllten Behälter standen und anschließend in einer Kühlzentrifuge bei $-4^{\circ}C$ 20 min bei 3000/min zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst quantitativ abgehoben und gemessen.

Bei dem größten Teil der Untersuchungen (die erste Versuchsgruppe) wurde das Plasma in dieser Form ohne Zeitverlust auf Ionenaustauscher-Säulen gegeben.

Bei einem anderen Teil erfolgte eine weitere Behandlung, indem das Plasma mit etwa 1/10 Vol. Perchlorsäure (5n) enteiweißt wurde. Der Überstand nach Zentrifugieren wurde in ein weiteres Zentrifugenglas überführt und mit Kaliumkarbonat (5n) auf ein pH von etwa 4 gebracht (Kontrolle mit pH-Papier) und im Tiefkühlfach eingefroren.

Nach den Erfahrungen von HÄGGENDAL sowie KUSCHKE können diese Extrakte auf solche Weise mehrere Wochen ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden Zur Weiterverarbeitung müssen die Proben nach dem Auftauen auf ein pH von

6,5 gebracht werden, um anschließend nach kurzem Zentrifugieren die Austauschersäulen zu passieren. (Falls der Arbeitsgang nicht unterbrochen wird, ist es erforderlich, daß die Extrakte für mindestens 30 min bei dem pH von 4 stehenbleiben, um das vollständige Ausfallen des Kaliumperchlorats zu ermöglichen).
Die Ergebnisse entsprachen denen, die mit unbehandeltem Plasma erzielt wurden.

e) Vorbereiten des Ionenaustauschers

DOWEX 50 WX 8, mesch 200-400
Suspendieren des Harzes in 5 Vol. Wasser und 10 min rühren, kurz absetzen lassen, trüben Überstand mit feinsten Teilen des Austauschers verwerfen. Vorgang 3 x wiederholen. Zum Harz in 1 Vol. Wasser 2n HCl in etwa 10 min unter ständigem Rühren zugeben. Rühren für 1 Stunde fortsetzen. Absetzen lassen, Überstand dekantieren, Harz 5 x mit reichlich Wasser waschen.

Überführen in die Na-Form durch langsames Zugeben von 5 Vol. 5 n NaOH während 10 min, 1/2 Stunde rühren. Nach absetzenlassen dekantieren. Mehrmals mit Aqua bidest. waschen.

Rückführen in die saure Form wie oben.

f) Präparation der Säulen zur Isolierung der KA

Die Glaswolle am Auslauf der Säulen wurde mit etwas Wasser angefeuchtet, und anschließend der Austauscher mit einer 2 ml Pipette gleichhoch eingeschwemmt (etwa 3,5 cm).
Danach spülen wie folgt:

1. 10 ml 2n HCl
2. 15 ml Aqua bidest., mit 1 ‰ EDTA-Zusatz.
3. 15 ml 1/10 n Phosphatpuffer, pH 6,5, bzw. so viel Puffer bis pH am Auslauf der Säule etwa 6,5.
4. 10 ml Aqua bidest., mit 1 ‰ EDTA-Zusatz
5. Plasma, bzw. Plasmaextrakt.

6. 20 ml Aqua bidest. mit 1 ‰ EDTA-Zusatz.

7. Eluieren mit 1n HCl.

Etwa 4 ml Eluat wurden in einem graduierten Zentrifugenglas aufgefangen. Es kam nur stärker saures Eluat zur Verwendung, d.h. die ersten Tropfen bis herunter zu einem pH von etwa 3,5 wurden verworfen. (Kontrolle mit pH-Papier).

g) Oxydation der Katecholamine

Reagenzien: NA-Standard, Stammlösung von 0,1 mg/ml
verdünnen auf 1 µg/ml (1:100)
1/10 n Phosphatpuffer, pH 6,5
Kaliumferrizyanid, 0,25 %
Natronlauge, 20 %
BAL-Na-Sulfit-Gemisch

Das Gemisch wurde erst kurz vor Beginn der Oxydation hergestellt (nur bis zu 2 h haltbar) und zwar aus 4 ml gesättigter Na-Sulfitlösung (5 g Na-Sulfitlösung ad 10 H_2O) und 20 λ BAL (unter Abzug). Zum Abmessen der geringen Menge BAL wurden Mikrocaps verwendet (Drummond Scientific Company). Die Na-Sulfitlösung muß mindestens alle 5 Tage neu angesetzt werden.

Ansatz:

	Eluat	Eluat-Leerwert	Reagens-Leerwert	NA-Standard
NA	--	--	0,1	0,1
Puffer	0,30	0,30	0,30	0,30
H_2O	--	--	1,9	1,9
Eluat	2,0	2,0	--	--
$K_3Fe(CN)_6$	0,1	0,1	0,1	0,1
BAL-Na-Sulfit	0,2	0,2	0,2	0,2
Na-OH	0,3	0,3	0,3	0,3

Die Oxydation erfolgte in Zentrifugengläschen.

Vorgehen im einzelnen:

Der pH-Wert des Eluats wurde kurz vor Beginn des Ansatzes mit Kaliumkarbonat (5n) auf 6,5 gebracht und die Menge des neutralisierten Extraktes gemessen. Sodann erfolgte die "Oxydation" der Eluatleerwerte und des Reagensleerwertes, gleich im Anschluß daran die zeitlich exakte Oxydation der eigentlichen Proben.

Eluatleerwert:

0,3 ml Phosphatpuffer wurden einpipettiert, darauffolgend 0,2 ml BAL-Na-Sulfit-Gemisch, als nächstes die 2 ml Eluat. Das Ganze wurde sorgfältig durchmischt und sodann 0,1 ml $K_3Fe(CN)_6$ und 0,3 ml NaOH dazupipettiert.

Reagensleerwert:

Dieser wurde behandelt wie der Eluatleerwert, nur daß an Stelle des Eluats 1,9 ml H_2O + 0,1 ml des frisch hergestellten NA-Standards verwendet wurden.

Eluatwert:

Zu 0,3 ml Puffer und 2 ml des neutralisierten Eluats wurden 0,1 ml Kaliumferrizyanid pipettiert und in diesem Augenblick eine Stoppuhr betätigt. Nach genau 3 min erfolgte dann die Unterbrechung des Oxydationsprozesses durch hinzufügen von 0,2 ml der 0,5 Prozent BAL enthaltenden Na-Sultitlösung, schnell gefolgt von 0,3 ml Natronlauge.

NA-Standard:

Hier wurden wiederum an Stelle des Eluats 1,9 ml Aqua bidest. + 0,1 ml NA-Standard verwendet; ansonsten handelte es sich um den gleichen Ablauf wie beim Eluatleerwert.

Alle Werte wurden nach etwa 15 min, vom Beginn der Oxydation gerechnet, abgelesen; dies erfolgte bei einer Aktivierungs-Wellenlänge von 395 mμ und einer Fluoreszenzwellenlänge von 540 mμ. Alle Versuche wurden bei gleicher Einstellung der Geräteempfindlichkeit abgelesen.

3. ERGEBNISSE

Nach intravenöser Injektion von 1 mg Glukagon kam es bei 14 der insgesamt 18 Versuchspersonen zu einem maximalen Anstieg der Blutzuckerkonzentration um mehr als 30 mg/% (Tabelle 1 und 2, Abbildung 1). Bei 4 Personen (Tabelle 1 Nr. 3, 8 und 11; Tabelle 2 Nr. 6) war die hyperglykämische Wirkung geringer oder fehlte. Die Wirkung des Glukagons auf den KA-Spiegel war dagegen viel stärker ausgeprägt. Alle Versuchspersonen reagierten mit einem Konzentrationsanstieg, der außerhalb der methodischen Fehlerbreite der Bestimmung lag und mehrfach das zwei- und dreifache des Ausgangswertes erreichte. Da bei jedem Probanden wegen der verhältnismäßig großen Blutmenge, die zur KA-Bestimmung benötigt wird, nur 1 bzw. 2 Proben entnommen wurde, ist das Maximum der Glukagonwirkung sicher nicht in allen Fällen erfaßt worden. Es kann daher keine sichere Aussage über die zeitlichen Abläufe der beiden Glukagoneffekte gemacht werden. Beide setzen offenbar bald nach der Injektion ein, wie die nach 5 und 10 min beobachteten Konzentrationsanstiege zeigen. Bei 4 Probanden ist immerhin zu erkennen, daß das Maximum des KA-Anstieges zeitlich vor dem höchsten Blutzuckeranstieg lag (Tabelle 1 Nr. 4, 6, 9, 12).

Durch eine fünftägige Reserpinbehandlung mit 12 mg wurde bei 3 der Probanden die Glukagon-Hyperglykämie deutlich abgeschwächt (Tabelle 2, Nr. 1, 2, 3); zugleich waren auch der Ausgangswert und der 30 min-Wert der KA-Konzentration bei zwei Patienten deutlich vermindert (Tabelle 2, Nr. 2, 3; Abbildung 3, Nr. 2, 3), während bei einem diese Bestimmung nicht durchgeführt werden konnte. Diese 3 Patienten waren erkennbar sediert, zeigten eine Kongestion der Nasenschleimhaut und einen leichten Tremor als Zeichen der Reserpinbehandlung. Bei einem weiteren Patienten (Nr. 4) waren die beiden Glukagoneffekte unter Reserpin bei geringer sedativer Wirkung ebenfalls gehemmt, jedoch nicht so deutlich wie bei den Ersteren. Bei den beiden anderen Patienten ohne Hemmung der Glukagonwirkung war auch kein eindeutiger sedativer Reserpineffekt zu erkennen. Der zeitliche Ablauf der Glukagon-Hyperglykämie erscheint nach der Reserpinbehandlung verzögert mit späterem Auftreten des Maximalwertes. Blutdruck und Pulsfrequenz blieben bei sämtlichen Versuchspersonen während der Untersuchung unverändert im Bereiche normaler Spontanschwankungen.

Tabelle 1: Veränderungen von Blutzucker (BZ)und Plasma-Katecholamin-Konzentration (KA) nach intravenöser Injektion von 1 mg Glukagon bei 12 Gesunden und nach Injektion von physiol. NaCl-Lösung bei 2 Probanden.

Versuchs-person Nr.	Leerwerte		nach 1 mg Glukagon intravenös 5 min		10 min		15 min		20 min		30 min		maximale Änderung	
	BZ mg%	KA µg/L.	BZ mg%	KA µg/L.	BZ mg%	KA µg/L.	BZ mg%	KA µg/L.	BZ mg%	KA µg/L.	BZ mg%	KA µg/L.	BZ ± mg%	KA ± µg/L.
1	92	0,24	120	0,29			172	0,37					+80	+0,13
2	108	0,27	104	0,49			141	0,89					+33	+0,62
3	132	0,43			140	1,12			147	1,22			+15	+0,79
4	106	0,65			115	1,22			141	1,13			+35	+0,57
5	85	0,23			130	0,70			112	0,45			+45	+0,47
6	102	0,44			110	1,03			143	0,80			+41	+0,59
7	98	0,26			133	0,62			124	0,38			+35	+0,36
8	90	0,45					81	0,60			56	0,37	-34	+0,15
9	75	0,20					129	0,73			148	0,30	+73	+0,53
10	93	0,36					143	1,00			122	0,62	+50	+0,64
11	93	0,42					105	0,61			102	0,44	+12	+0,19
12	89	0,23					112	0,35			130	0,25	+41	+0,12
Mts:	97 ± 14	0,35 ± 0,13			126 ± 12	0,94 ± 0,26	126 ± 28	0,65 ± 0,24	133 ± 15	0,80 ± 0,38	111 ± 35	0,40 ± 0,14		
	nach physiol. NaCl-Lösung													
6	107	0,29			108	0,26			110	0,25				
11	94	0,30					99	0,34			102	0,22		

Tabelle 2: Veränderungen von Blutzucker (BZ) und Plasma-Katecholamin-Konzentration (KA) nach intravenöser Injektion von 1 mg Glukagon bei 6 psychisch Kranken vor und nach einer fünftägigen Medikation von 12 mg Reserpin.

Versuchsperson		Leerwert BZ mg%	Leerwert KA µg/L.	nach 1 mg Glukagon intravenös 10min BZmg%	15min =	20min =	30min = KA µg/L.	45min BZmg%	60min =	maximale Änderung BZ ±mg%	maximale Änderung KA ± µg/L.	
1	Kontrolle	80		110		148	144	110		+68		Sedation
St. A. ♀	Reserpin	91		98		105	114	127		+36		
2		113	0,29	132		208	127	0,82	138	+95	+0,53	Sedation, Tremor, nasale
Sch. A. ♂		88	0,08	116		132	138	0,19	144	+56	+0,11	Kongestion
3		96	0,36		118		146	1,14	125	144	+50	+0,78	Sedation, Tremor, nasale
Schau. A. ♂		97	0,13		115	112	112	0,34	112	120	+23	+0,21	Kongestion
4		84	0,21		117		93	0,31	73	68	+33	+0,10	wenig sediert
St. K. ♂		79	0,13		90		104	0,20	86	81	+25	+0,07	
5		90	0,24	99		142	114	0,76	110		+52	+0,52	wenig sediert
Kä. E. ♂		111	0,12	133		152	122	0,87	152		+41	+0,75	Tremor
6		93	0,37		113		116	0,69	116	97	+23	+0,32	wenig sediert
Kx. L. ♂		86	0,33		96		133	0,76	141	135	+55	+0,43	

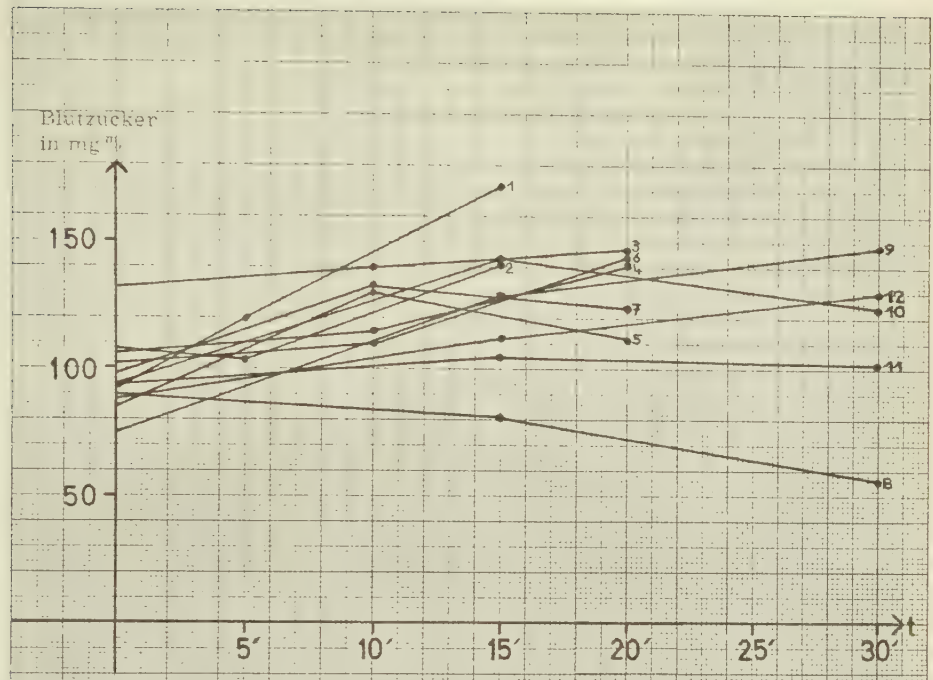

Abb. 1
Blutzuckerwerte nach 1 mg Glukagon

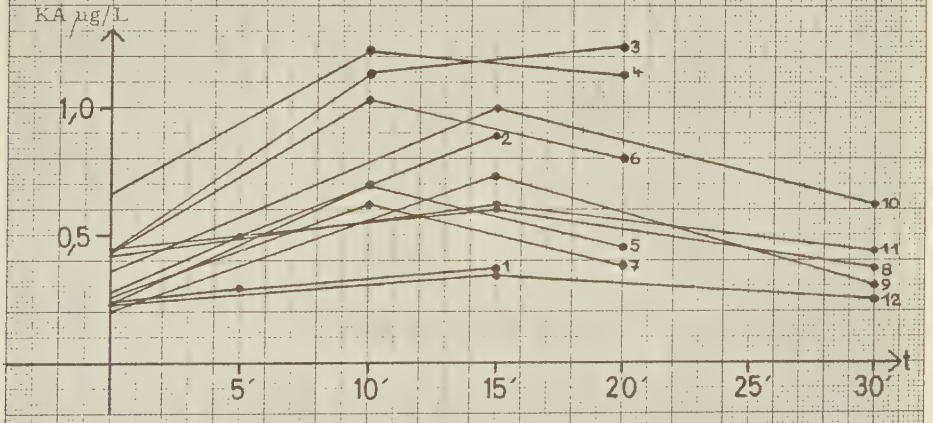

Abb. 2
KA - Werte nach 1 mg Glukagon

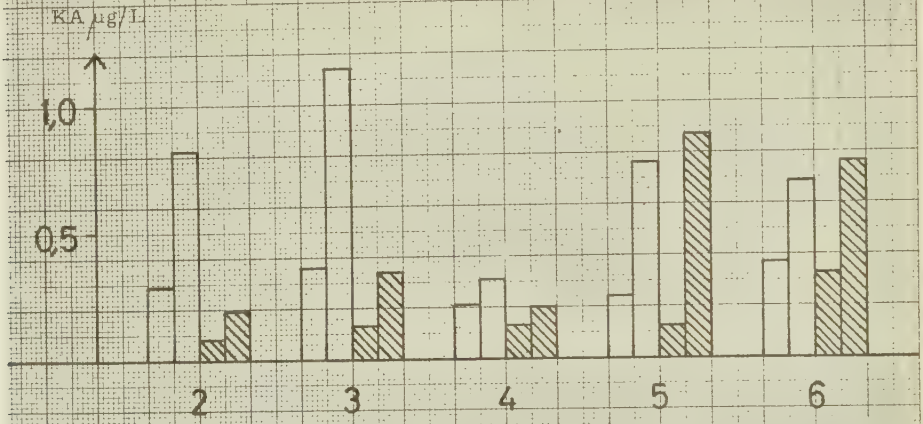

Abb. 3:

KA - Werte vor (helle Säulen) und nach (schraffierte Säulen) Reserpinbehandlung.

4. DISKUSSION

Die tierexperimentell nachgewiesene Freisetzung sympathischer Überträgerstoffe durch Glukagon tritt nach unseren Befunden auch beim Menschen nach Injektion der vergleichsweise kleineren Dosis von 1 mg auf. Diese Befunde stützen die auf Grund der tierexperimentellen Untersuchungen geäußerte Vermutung, daß die hyperglykämische Glukagonwirkung teilweise durch eine Freisetzung von Sympathikusstoffen vermittelt wird (DRESSE et al., 1964, SARCIONE et al., 1963, LEFEBVRE et al., 1961, SARCIONE und Mitarb., 1960).
Ein solcher Mechanismus könnte auch der Hemmung der Darmmotilität durch Glukagon beim Menschen (DOTEVALL, G. and N. G. KOCK, 1963) zu Grunde liegen. Schließlich wird Glukagon, dessen Sekretion durch Hypoglykämie ausgelöst wird (UNGER et al., 1962, UNGER und EISENTRAUT, 1964), als Mittlersubstanz für die Adrenalinfreisetzung bei der Hypoglykämie, deren Mechanismus unbekannt war (EULER, IKKOS und LUFT, 1961), angesehen (SARCIONE et al., 1963). Eine solche durch Glukagon vermittelte Beteiligung der Sympathikusstoffe an der Hypoglykämie-Gegenregulation kann als zusätzliche Sicherung des Organismus gegen hypoglykämische Schäden aufgefaßt werden. Ein wesentlicher Bestandteil der Gegenregulation ist sie aber vermutlich nicht, da bei doppelseitig adrenalektomierten Patienten die hypoglykämische Reaktion auf Insulin trotz der verminderten Adrenalinfreisetzung nicht verstärkt ist, sondern unverändert bleibt (EULER, IKKOS und LUFT, 1961).

Der weiteren Klärung der Frage, ob und in welchem Ausmaß die Katecholamine zur Hyperglykämie nach exogener Glukagongabe beitragen, sollten die Untersuchungen nach Reserpinvorbehandlung dienen. Wenn die Amine an der Entstehung der Glukagon-Hyperglykämie beteiligt sind, sollte eine Verminderung ihrer Gewebskonzentration durch eine hochdosierte Reserpinbehandlung zu einer Abnahme der Hyperglykämiereaktion führen. Untersuchungen über die hyperglykämische Glukagonwirkung bei adrenalektomierten Patienten, die in

diesem Zusammenhang von Interesse wären, sind nicht bekannt. Die beim Menschen anwendbaren Reserpindosen liegen zwar erheblich unter denen, die im Tierversuch zu einer starken Senkung des Gewebsspiegels an Katecholaminen führen, doch könnten hohe Wirkspiegel wie im Tierversuch durch Kumulation wiederholter Gaben erreicht werden. Sicher ist die individuelle Empfindlichkeit gegen Reserpin verschieden, wie die unterschiedliche Sedierung unserer Patienten zeigte. So war nicht zu erwarten, daß die Befunde dieser Serie einheitlich ausfallen würden. Immerhin zeigte sich, daß die Patienten, welche unter Reserpin sediert waren, parallel mit einer verminderten Katecholaminfreisetzung auch eine Abschwächung der Hyperglykämiereaktion auf Glukagon hatten, so daß man diese als durch die freigesetzten sympathischen Überträgerstoffe mitverursacht ansehen kann.

Während der stark erhöhten Katecholaminplasmaspiegel nach Glukagon waren eigentlich Kreislaufreaktionen zu erwarten. Da weder subjektive Erscheinungen noch objektive Blutdruck- oder Pulsfrequenzänderungen auftraten, erwogen wir als Erklärungsmöglichkeit für diese Diskrepanz, daß Glukagon nicht nur die Sympathikusstoffe aus ihren Gewebsbindungen freisetzt, sondern auch wie ein adrenerger Hemmstoff ihre Bindung an die Effektorzellen hindert. Dieser Frage wäre noch nachzugehen.

Die Glukagondosis von 1 mg ist verhältnismäßig hoch. Die danach zu erwartenden Plasmakonzentrationen liegen wahrscheinlich höher als die unter physiologischen Verhältnissen beim Menschen mit radioimmunologischer Technik gemessenen Mengen von 0-1 µg/L Plasma (UNGER und EISENTRAUT, 1964, UNGER, persönl. Mitt. 1965). Allerdings ist die Abbaugeschwindigkeit injizierten Glukagons nicht bekannt, und wir sahen in zwei orientierenden Versuchen nach Injektion von nur 0,1 mg Glukagon die gleiche Reaktion von Blutzucker- und Plasmakatecholaminspiegel wie nach Injektion von 1 mg. So muß vorerst offen bleiben, ob dem Katecholamin freisetzenden Glukagoneffekt auch unter physiologischen Verhältnissen eine Bedeutung zukommt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Intravenöse Injektion von 1 mg Glukagon führte bei 14 von 18 Versuchspersonen zu einer Blutzuckersteigerung von mehr als 30 mg% und in allen Fällen zu einer deutlichen Erhöhung des Plasmaspiegels der Katecholamine. Injektion von 0,1 mg Glukagon bei zwei Versuchspersonen hatte den gleichen Effekt.

Nach fünftägiger Vorbehandlung mit 12 mg Reserpin bei 6 psychisch Kranken waren die hyperglykämische und die Katecholamin freisetzende Wirkung des Glukagons bei 4 der Patienten vermindert.

Die Befunde bestätigen beim Menschen die bisher tierexperimentell gefundene Katecholamin freisetzende Wirkung des Glukagons.

Die Bedeutung dieser Glukagoneffekte für seine physiologische Wirkung wird diskutiert.

Mein besonderer Dank für das Zustandekommen dieser Arbeit gilt dem Direktor der Medizinischen Universitätsklinik, Herrn Professor Dr. E. Wollheim für die freundliche Überlassung eines Laborplatzes, sowie meinem Doktorvater Herrn Priv. Dozent Dr. H. J. Kuschke, der mir das Thema überließ und mich jederzeit mit seinem Rat unterstützte.

Würzburg, im Januar 1966

6. LITERATUR

AMATUZIO, D.S., A. L. SCHAULTZ, M. J. VANDERBILT, E. D. RAMES and S. NESBITT: The effekt of epinephrine, insulin and hyperthyreoidisme on the rapid intravenous glucose tolerance test. J. clin. Invest. 33, 97-102 (1954)

CORI, C. F. and G. T. CORI: The effekt of epinephrine on arterial and venous blood sugar in men. J. biol. Chem. 84, 699-701 (1929)

CORI, C. F., R. E. FISHER and G. T. CORI: The effect of epinephrine on arterial and venous plasma sugar and blood flow in dogs and cats. Amer. J. Physiol. 144, 53-68 (1935)

CORI, C. F.: Enzymatic reaktions in carbohydrate metabolism. Harvey lect. 41, 253-272 (1845-46)

DOTEVALL, G. and N. G. KOCK: The effect of glucagon on intestinal motility in man. Gastroenterology 45, 364 (1963)

DRESSE, A., P. LEFEBVRE, J. LECOMPTE et H. CAUWENBERGHE van: Nouvelle mise en évidence de la liberation par le glycagon de l´adrénaline surrénalienne. Compte. rend. Soc. de Biol. 155, 1168 (1964)

EULER, U. S. von, D. IKKOS and R. LUFT: Adrenaline excretion during resting condition and after insulin in adrenalectomized human subjects. Acta endocrinol. 38, 441 (1961)

FARAH, A. and R. TUTTLE: Studies of the pharmacology of glucagon. J. Pharmacol. exper. Ther. 129, 49-55 (1960)

HÄGGENDAHL, J.: An improved method for fluorometric determination of small amounts of adrenaline and noradrenaline in plasma and tissues. Acta physiol. scand. 59, 242 (1963)

ITALLI, T. B. van and W. B. A. BENTLEY: Glucagon induced hyperglycemia as an index of liver function. J. Clin. Invest. 34, 1730-1737 (1955)

KREISBERG, R.A. and J.R. WILLIAMSON: Metabolic effects of glucagon in the perfused rat heart. Amer. J. Physiol. 207, 721-727 (1964)

LEFEBVRE, P., A. DRESSE, H. KAUWENBERGHE van et J. LECOMTE: Influence de glucagon sur le taux des catecholamines surrénaliennes chez le rat. Compt. rend. Soc. de Biol. 155, 412 (1961)

LEFEBVRE, P., M. PALEM-VLIERS et H. CAUWENBERGHE van: Le glucagon stimule-t-il le cortex surrenalien du rat. C. R. Soc. Biol. 155, 172 (1961)

LEFEBVRE, P. et H. CAUWENBERGHE van: Ou en est le problème du glucagon? Rev. Franc. études clin. et biol. 8, 805-816 (1963)

REGAN, T.J., P.H. LEHAN, D.H. HENNEMAN, A. BEHAR and H.K. HELLENS: Myocardial metabolic and contractile Response to glucagon and epinephrine. J. Lab. Clin. Med. 63, 638-647 (1964)

SARCIONE, E.J., J.E. SOKAL and K.E. GERSZI: Relationship of the adrenal medulla to the hyperglycamic effect of glucagon. Endocrinology 67, 337 (1960)

SARCIONE, E.J., N. BACK, J.E. SOKAL, B. MEHLMAN and E. KNOBLOCK: Elevation of plasma epinephrine levels produced by glucagon in vivo. Endocrinology 72, 523 (1963)

SCHMID, E., L. ZICHA und W. JOHN: Über die Ausscheidung der Vanillinmandelsäure und anderer Phenolsäuren im Harn bei Lebergesunden und Leberkranken und ihre Beeinflussung durch Glukagon. Zeitschr. Gastroenterol. 2, 214 (1964)

SCIAN, L.F., C.D. WESTERMAN, A.S. VERDESKA and J.G. HILTON: Adrenocortical and medullary effects of glucagon. Amer. J. Physiol. 199, 867 (1960)

SOMOGYI, M.: Mechanisme epinephrine-hyperglycemia. Endocrinology 49, 774-781 (1951)

SUTHERLAND, E. W.: The effect of the hyperglycemic factor of the pancreas and of epinephrine on glucogenolysis. Rec. Prog. Horm. Res. 5, 441 (1950)

SUTHERLAND, E. W. and T. W. RALL: The relation of adenosine 3, 5, -phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. Pharmacol. Rev. 12, 265-300 (1960)

UNGER, R. H., A. M. EISENTRAUT, M. S. Mc CALL and L. L. MADISON: Measurements of endogenous glucagon in plasma and the influence of blood glucose concentration upon its secretion. J. Clin. Invest. 41, 682 (1962)

UNGER, R. H. and A. B. EISENTRAUT: Studies of the physiologic role of glucagon, Diabetes 13, 645 (1964)

UNGER, R. H.: persönl. Mitteilung 1965

Lebenslauf

Am 16. September 1937 wurde ich, Helmut Klusmann, als Sohn des Dachdeckermeisters Otto Klusmann und dessen Ehefrau Erna, geborene Hoff, in Celle geboren. Seit dem Herbst 1943 besuchte ich an meinem Heimatort Dollbergen die Volksschule, erst ab Ostern 1950 das Gymnasium Uetze, an dem ich im Februar 1960 das Abitur bestand. Im Herbst 1957 ist mein Vater gestorben.
Gleich nach dem Abitur begann ich in Freiburg das Studium der Medizin, absolvierte dort die vorklinischen Fächer, ging anschließend für ein Semester nach Kiel, kam im Wintersemester 1963/64 nach Würzburg und legte dort im Wintersemester 1966/67 das medizinische Staatsexamen ab.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Klusmann

IBM-SCHREIBSATZ, OFFSETDRUCK
G U G E L
87 Würzburg, Burkarderstr. 9

IBM-SCHREIBSATZ, OFFSETDRUCK
G U G E L
87 Würzburg, Burkarderstr. 9